

2 波長ピコ秒赤外超解像顕微鏡の開発と細胞への応用(1)

(東工大資源研¹・東工大統合研究院^{1,2})○酒井 誠¹、大森 努²、藤井正明^{1,2}

【序】 分子振動は「分子の指紋」に例えられるように分子の構造を鋭敏に反映する。このためラマン分光法を中心として生体分子の構造解析やダイナミクス計測に用いられており、最近では単一細胞にまで対象は拡大しつつある。一方、振動分光法のもう1つの代表である赤外分光法はラマン分光に比べると生体計測に対してあまり利用されていない。これは、赤外波長によって一意に決まる回折限界のため赤外光をマイクロメートル以下に絞り込むことが物理的に困難であり高い空間分解能が得られないこと、また、赤外光に連続光源を用いていたためにダイナミクス計測に不向きであったことに起因する。赤外分光法はラマン分光法と相補的な情報を与えること、特に分子の特徴を示す官能基を鋭敏に反映して分子の機能や環境を計測する上で極めて有効な情報を与えることは周知である。もし、特定の赤外吸収の空間分布を例えば細胞のサイズ以下（サブミクロン）でマッピングし、その時間的な変化を追跡する事が可能となれば、細胞内部のような不均一な環境で起きる反応ダイナミクスをアニメーションの様に可視化することも可能なはずである。我々は、これらを実現すべく、新規な赤外超解像顕微鏡の開発を行った。さらに、この方法を細胞にも適用したので報告する。

【赤外超解像原理】 赤外超解像は、赤外光と可視光を用いた二重共鳴分光法である過渡蛍光検出赤外分光法をレーザー蛍光顕微鏡へ応用することによって達成される。

過渡蛍光検出赤外分光法（図1）は、従来、振動緩和の研究手段¹⁻²として用いられているものであり、第1の赤外レーザー光によって特定の振動に赤外励起した分子のみを第2の可視レーザー光により選択的に電子励起することで生じる S_1 状態からの蛍光（過渡蛍光）を検出する分光法である。この方法を実現する鍵は赤外光によって振動励起された分子の振動緩和である。すなわち、振動緩和するよりも前に可視光で S_1 状態に電子励起することが必要不可欠である。従って、過渡蛍光検出赤外分光（＝赤外超解像顕微分光）をピコ秒パルスレーザーで実行することが必須である。また、これにより、赤外光と可視光の遅延時間の関数として振動緩和とダイナミクスを測定することも可能となる。空間分解能に関しては、赤外

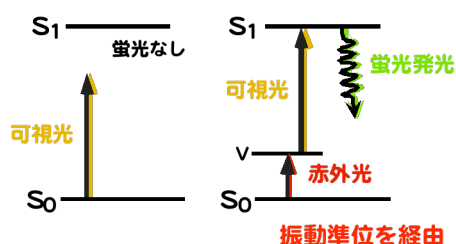


図1：過渡蛍光検出赤外分光法

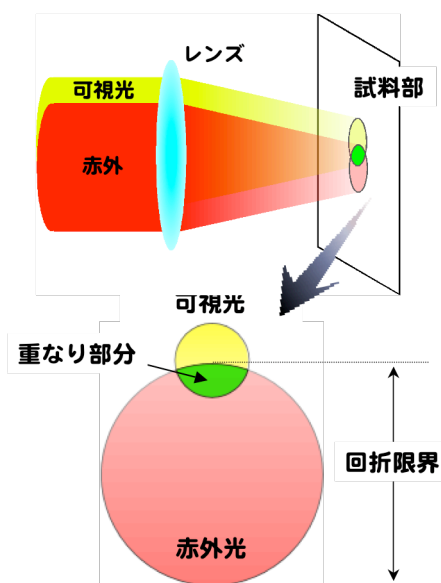


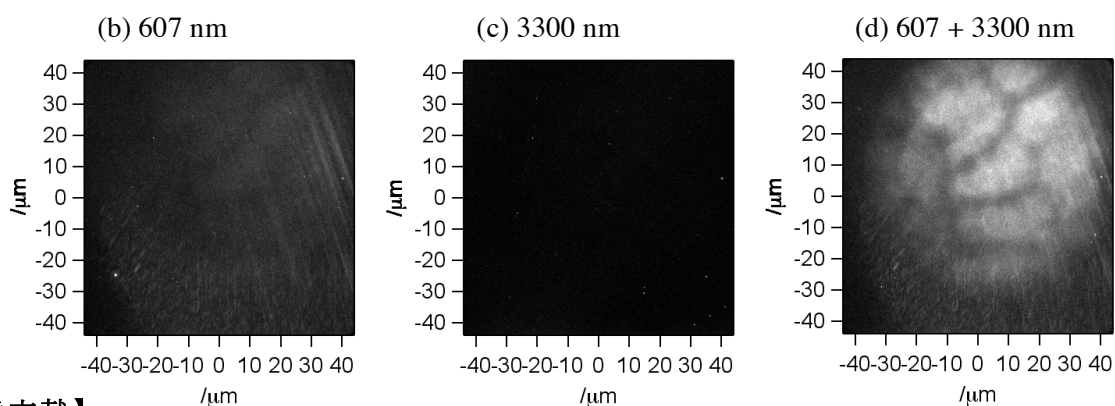
図2：赤外超解像原理

光と可視光が重なった部分からのみ蛍光が発生する現象を超解像原理に利用する(図2)。赤外光および可視光はそれぞれの NA と波長で一意に決まる回折限界以下に集光できないが、この重なり部分の蛍光領域は、原理上無限に小さくすることが可能である。反面、この方法では大きさの制御や光軸合わせ等が困難である。従って、我々は赤外光と可視光を完全に重ねる方法を採用した。この場合、重なり部分は赤外光の回折限界よりも遥かに小さな可視光の回折限界まで収縮可能である。即ち、赤外の振動情報を可視光の回折限界に依存する空間分解能で取り出す赤外超解像顕微分光が実現できる。

【結果と考察】 図3にシロイヌナズナの毛根細胞に赤外超解像顕微鏡法を適用した結果を示す。試料は、発芽直後の種子をローダミン6Gで染色後、塩酸処理により薄片化してプレパラート化した。2色のピコ秒レーザー(可視光: 539 nm および 607 nm、赤外光: 3300 nm)は、同軸から焦点距離 100 mm の CaF₂ レンズで 100 μm φ 程度の大きさに調節して集光し試料部全面へ照射した。蛍光(過渡蛍光)は背面から NA = 0.25 の対物レンズで集め、ICCD 検出器へ結像した。このときの蛍光波長領域(570 nm)における空間分解能は 1.4 μm であった。(a)には比較のため、539 nm の光を用いた 1-color の蛍光像を示す。これは通常のレーザー蛍光顕微鏡と全く同じものであり、およそ 15 μm 程度の大きさの細胞がいくつか集まった像が観測されている。(b)-(d)は赤外超解像法を適用した結果である。(b)可視光(607 nm)のみ、あるいは(c)赤外光(3300 nm)のみを入射した場合には蛍光は観測されないが、(d)両者(607 + 3300 nm)を同時入射した場合には過渡蛍光像が明瞭に観測された。この過渡蛍光像は、実際には、染色試料であるローダミン6Gの赤外吸収に共鳴して観測されたものであり、細胞自身の赤外吸収と対応しているものではない。しかしながら、我々の開発した赤外超解像顕微鏡法が細胞に対して適用可能であることを示す結果であり極めて重要である。講演では、時間分解測定、波長依存測定などの赤外超解像顕微分光の結果についても述べると共に、細胞内での振動緩和現象についても議論する。

図3：シロイヌナズナの毛根細胞の顕微像

試料提供：北海道大学・電子科学研究所 金城政孝先生



【参考文献】

1. A. Seilmeier, W. Kaiser, A. Laubereau, S.F. Fischer, *Chem. Phys. Lett.* **58** (1978) 225.
2. M. Sakai, M. Fujii, *Chem. Phys. Lett.* **396** (2004) 298.